- равномерность распределения клеток на мазке;
- отмечают степень слипания клеток (агрегация);
- регистрируют характер и распространение повреждения головной и хвостовой частей клеток;
- обращают внимание на различие размеров головной части клетки и другие изменения, по сравнению с контролем (исходная сперма до замораживания).

Техника и способы приготовления и микроскопирования мазков для дефростированной спермы те же, что и для мазков нативной спермы.

С помощью описанной методики нами были апробировано шесть из 15-и криопротекторов, качество которых предполагается оценить окончательно по оплодотворяющей способности спермиев.

Возможности микроскопической оценки качества спермиев довольно широкие. В настоящее время в нашей лаборатории в сотрудничестве с другими научными коллективами мы разрабатываем гистохимические методики для выявления различных химических соединений (нуклеопротеиды, липиды, гидролазы и т.д.), а также методы анализа на субклеточном уровне (электронная микроскопия).

Таким образом, изложенный выше способ оценки качества спермы с помощью световой микроскопии до и после криоконсервации репродуктивных клеток вполне доступен в любых условиях, не требует дорогостоящей аппаратуры. Данный способ, возможно, использовать в различных направлениях развития рыбоводства.

SUMMARY

Experimental data by definition of sperm quality of stellate sturgeon after storage of a seed liquid are submitted at temperature - 196° C. Quality of man›s gametes estimated by sperm smear microscopic examination and by impregnating ability of sperm after defrostation.

А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, Е.А. Назина, Э.Н. Гахова
Институт биофизики клетки РАН

ОБРАЗОВАНИЕ ЛЬДА ПРИ ЗАМЕРЗАНИИ КРИОЗАЩИТНЫХ РАСТВОРОВ

Устойчивость к криоповреждениям спермы у разных видов рыб кардинально различается. Единой методики криоконсервации для рыб нет, т.к. среда обитания сильно различается для разных видов (например, морские и пресноводные виды, проходные и оседлые рыбы и т.д.). Если для морских рыб, устойчивых к высокому осмотическому давлению окружающей воды, удается получить высокие показатели выживания спермиев после процедуры замораживания-оттаивания без особых затруднений, то для проходных и пресноводных видов приходится искать уникальные способы и методы криоконсервации, особые криозащитные среды для каждого вида, причем процент подвижных клеток после оттаивания обычно невелик (Maisse, 1996). Способы криоконсервации различаются обычно: а) по составу основного криозащитного раствора и наличию дополнительных компонентов (сахара, белки, яичный желток, липиды; б) по скоростям охлаждения; в) используемому криопротектору; г) объему замораживаемого материала. Считается, что существенную роль в криоповреждении могут играть кристаллы льда, формирующихся при замерзании криозащитных растворов. Образование кристаллов льда наряду с другими негативными факторами (осмотический шок, латеральная диффузия липидов и белков, рекристаллизация при оттаивании, токсичность растворов криопротекторов) значительно снижает выживаемость клеток после процедуры замораживания-оттаивания при криоконсервации живых клеток и, в частности, сперматозоидов (Пушкарь, Грищенко, 1994).

В связи с этим мы исследовали насколько коррелирует размер и форма кристаллов льда, образующихся при замерзании криозащитных растворов и выживаемость спермиев, влияние скорости замерзания, объема пробы и добавочных компонентов среды (сахара, яичный желток) на образование кристаллов льда при замерзании криозащитных растворов, и на сохранение физиологических свойств спермиев рыб (осетр, белорыбица).

Криоконсервацию спермиев осетра и белорыбицы проводили совместно с сотрудниками Астраханского госуниверситета Тихомировым А.М., Земковым Г.Н., Акимочкиной Т.И., Шинтимировой Ф.И.

В экспериментах по определению параметров кристаллов льда использовали криомикроскопическую установку: микроскоп, видеоокуляр, избражение регистрировали на компьютере. Площадь и периметр кристаллов определяли с помощью программы “Trace 1.26b”. Температуру пробы регистрировали на компьютере через АЦП L-154 (L-Card) с помощью медно-константановой микротермопары. Режимы охлаждения описаны в результатах.

Состав криозащитного раствора: базовый раствор (физиологический раствор для соответствующей рыбы + 10% ДМСО), яичный желток - 10%, минорные компоненты.

Изучали три варианта скорости охлаждения криозащитной среды: медленное, быстрое, сверхбыстрое (рис.1). Для каждого варианта мы определяли образование кристаллов льда при замерзании и сохранение подвижности и оплодотворяющей способности спермиев после процедуры замораживание-оттаивание.

В экспериментах на спермиях русского осетра было показано, что для сохранения жизнеспособности критичными параметрами является как состав криозащитной среды (солевой состав базового раствора, присутствие криопротектора, минорные компоненты), так и скорость охлаждения (рис. 2). В режиме 1 после замораживания–оттаивания во всех изученных криозащитных растворах обнаруживали только единичные подвижные клетки как при замораживании спермиев осетра, так и при замораживании спермиев белорыбицы. В режиме 2 и 3, как для осетра, так и для белорыбицы количество подвижных сперматозоидов резко увеличивалось, количество икринок, оплодотворенных криоконсервированной спермой, был близок к заводскому контролю. Очевидно, что для сохранения жизнеспособных клеток имеет значение не только состав криозащитных растворов, но и скорость охлаждения. Единственный параметр который меняется при этом – размер и форма кристаллов льда, образующихся при замерзании. При этом

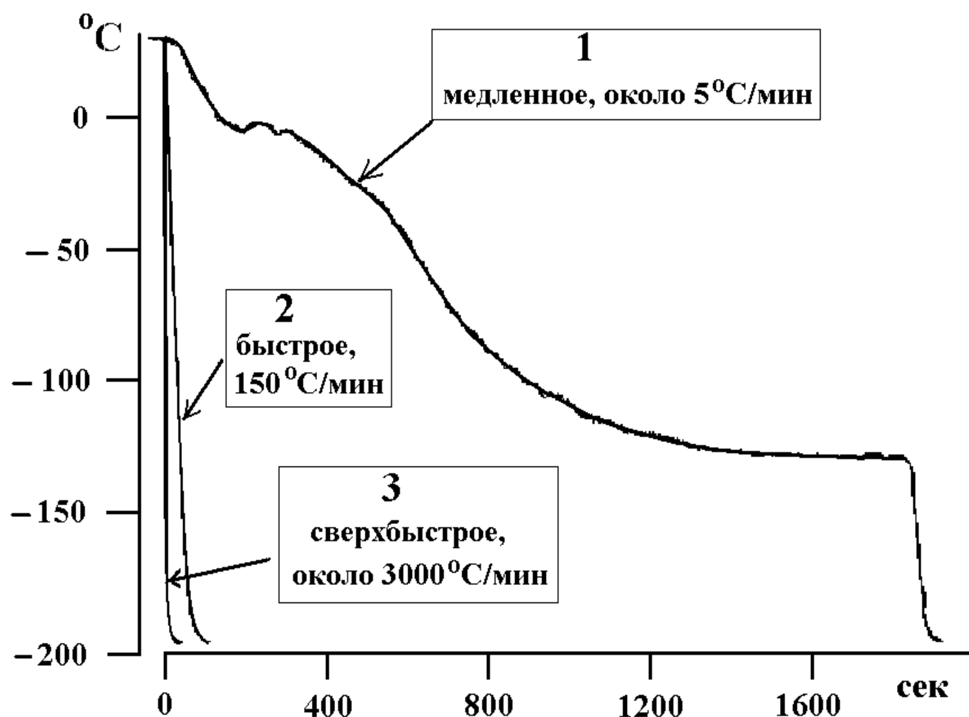


Рисунок 1. Температура в образцах при охлаждении.
1. Охлаждение в парах азота (-130° С), средняя скорость около 5° С/мин, объем пробы 0,5 мл, полиэтиленовая пробирка. При -130° С погружение в жидкий азот.
2. Охлаждение на тефлоновой подложке (-196° С), гранула 50 мкл, скорость охлаждения около 150° С/мин.
3. Охлаждение на стеклянной подложке (-196° С), толщина образца около 0,1 мм

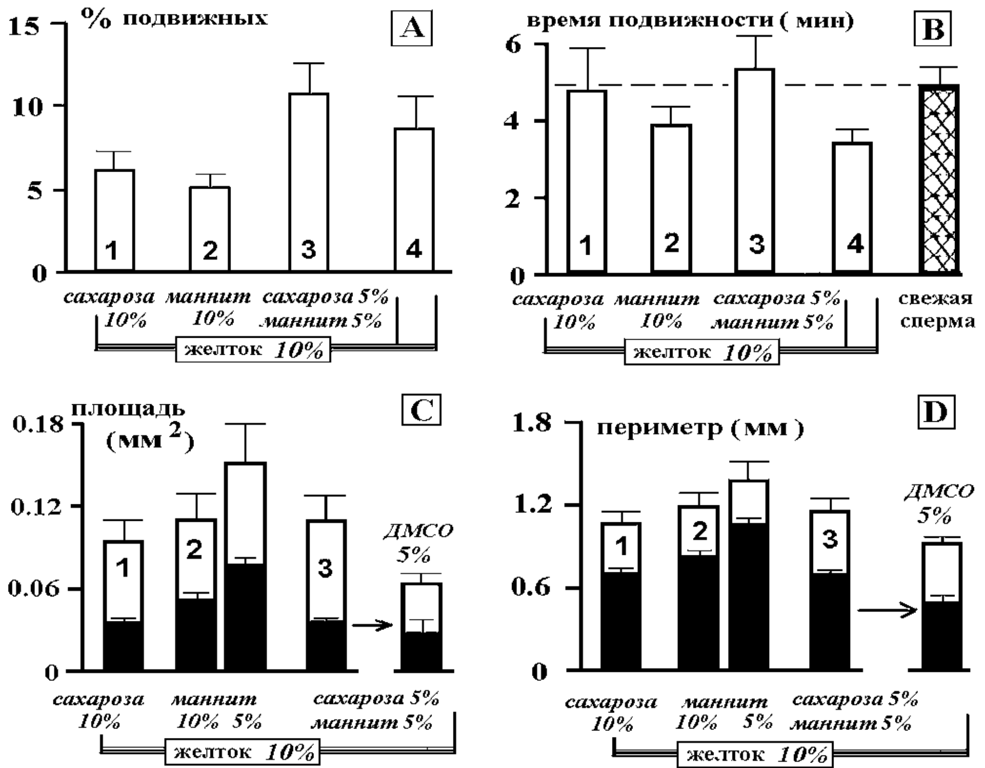


Рисунок 2. Параметры кристаллов льда и сохранность спермиев после криоконсервации

необходимым условием было присутствие в криозащитном растворе ДМСО и яичного желтка. Сахара в криозащитном растворе могли как улучшить (рис.2А, раствор 3, рис 2В раствор 1,3), так и ухудшить (рис 2А, раствор 1,2, рис 2В раствор 2) эффективность криоконсервации по тем или иным параметрам. При этом размер и форма кристаллов льда, образующихся при замерзании криозащитных растворов, кардинально меняется (рис.2 C,D). Кристаллы, образующиеся при медленном охлаждении раствора (режим 1), значительно больше по площади и периметру, чем при быстром (режим 2). При сверхбыстром охлаждении в тонком слое раствора (режим 3) кристаллы не образуются. Видно, что скорость охлаждения значительно уменьшает площадь и периметры кристаллов льда.

С учетом всех параметров оптимальными условиями для криоконсервации были использование раствора 3 (рис.2 А,В) при быстром и сверхбыстром охлаждении.

Следует отметить, что размер кристаллов льда при замерзании не всегда определял эффективность криозащитного раствора. Присутствие в растворе яичного желтка существенно увеличивало размер кристаллов льда, увеличение концентрации сахаров уменьшало размеры кристаллов, но общим при этом является то, что существенно изменялась форма кристаллов, грани размывались, формируя округлые глобулы. При этом, увеличение размеров округлых кристаллов не снижало выживаемость спермиев после замораживания-оттаивания.

То же самое мы видим на примере наших растворов: наилучшие показатели по числу подвижных клеток и времени их подвижного состояния наблюдали не в растворе с минимальной площадью и периметром кристалов, а в сложном растворе 3.

Таким образом, можно заключить, что при поиске эффективных криозащитных составов надо учитывать не только размер и периметр кристаллов льда образующихся при замерзании криозащитного раствора, но и форму кристаллов. Наиболее эффективны криозащитные растворы, при замерзании которых образуются кристаллы округлой формы, или наблюдается картина, близкая к стеклованию.

А, В - выживаемость спермиев осетра после криоконсервации в режиме 2. Несмотря на то, что количество подвижных

клеток значительно снижено, время подвижного состояния после процедуры замораживания-оттаивания для вариантов криозащитного раствора 1 и 3 не отличается от свежей спермы. C, D - параметры кристаллов, образующихся в режимах охлаждения 1, 2, показанных на рис 1.

Медленное (5° С/мин) охлаждение (светлые столбцы) и быстрое (150° С/мин) охлаждение (темные столбцы). При сверхбыстром (около 3000° С/мин) охлаждении в тонком слое среды (режим 3) кристаллы не образуются

Работа выполнена при совместной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности и науки Московской области (грант № 04-04-97300).

РЕЗЮМЕ

Изучали влияние добавочных компонентов криозащитной среды и скорости ее охлаждения на криоконсервацию спермы рыб. Показано, что скорость охлаждения и дополнительные компоненты криозащитной среды могут эффективно влиять на размер и форму кристаллов льда и выживаемость спермиев после процедуры замораживания-оттаивания.

ABSTRACT

Influence of additional components and velocity of the cooling on freezing cryoprotective medium has been studied using a cryomicroscopy technique. It has been shown that additional components and cooling rate on the freezing of cryoprotective medium fundamentally change the ice crystal area and survival of fish spermatozoa at procedure of freezing-thawing.

Литература

1. Maisse G. Cryopreservation of fish semen. Refrigeration and Aquaculture. Bordeaux, 1996, p. 443-457.

2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. К., «Наукова думка», 1994, 431 с.

УДК: 615.361.018.46.014.41:57.084:547.42

Л.А. Водопьянова, Г.Ф. Жегунов

Харьковская государственная зооветеринарная академия

СОХРАННОСТЬ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СОБАК ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С КРИОПРОТЕКТОРАМИ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

В настоящее время интенсивно используются методы лечения тяжелых форм различных заболеваний (анемия, нарушения гемопоэза, иммунодефициты и др.) с помощью клеток костного мозга, которые могут развиваться в различные клетки крови [8].

Замораживание в жидком азоте с криопротектором позволяет хранить клетки донора в течении нескольких лет [7, 8].

В настоящее время для криоконсервирования клеток костного мозга человека используются диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленоксид М.м. 400 (ПЭО-400), глицерин и другие криопротекторы [2, 3]. В ветеринарии еще не разработаны методы криоконсервирования костного мозга, хотя этот вопрос является актуальным и перспективным.

Цель исследования - оценить чувствительности клеток костного мозга собак к действию некоторых криопротекторов, а так же выявить их сохранность после замораживания в жидком азоте.

Конечная концентрация ДМСО при добавлении к суспензии костного мозга была 10%, 7%, 5%, ПЭО-400 - 10%, 15%, 20% , глицерин 10%, 20%, 30%. Инкубация с ДМСО проводилась 10 минут, ПЭО-400 и глицерином 30 минут в условиях + 4° С.

Замораживание проводилось двухступенчато: первый этап - погружение в пары азота (-80° С, температура контролировалась термопарой), второй этап погружение в жидкий азот [4-8]. Размораживание проб производили на водяной бане +41° С при постоянном покачивании в течении 1-3 минут.

Удаление криопротектора из суспензии проводили с помощью рабочей среды, добавленной в 5-10 кратном объеме к суспензии с дальнейшим центрифугированием.

Как метод оценки сохранности клеток костного мозга применяли прижизненную окраску с трипановым синим. Средний показатель сохранности клеток в свежеполу-